

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

01 OCT 2004



REC'D 18 OCT 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung****Aktenzeichen:**

103 44 965.5

**Anmeldetag:**

27. September 2003

**Anmelder/Inhaber:**Leica Microsystems Heidelberg GmbH,  
68165 Mannheim/DE**Bezeichnung:**

4Pi-Mikroskop

**IPC:**

G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. August 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Hoß

### 4Pi-Mikroskop

5

Die Erfindung betrifft ein 4Pi-Mikroskop mit einem Interferometer, in dem zwei Objektive einander gegenüberliegend auf unterschiedlichen Seiten einer Probenebene angeordnet sind, und mit einem optischen Element mit dem Beleuchtungslicht in das Interferometer einkoppelbar und/oder mit dem Detektionslicht aus dem Interferometer auskoppelbar und auf einen Detektionsstrahlengang lenkbar ist.

15

In der Rastermikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe ausgehende Reflexions- oder emittierte Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichts wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahls gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

20

Speziell in der konfokalen Rastermikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet. Ein konfokales

Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlableitvorrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine  
5 Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird dabei über den Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht gelangt über die Strahlableitvorrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden,  
10 hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion im Objekt stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man nur Informationen aus der Fokusregion erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führen. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch  
15 schichtweise Bilddatenaufnahme erzielt, wobei die Bahn des Abtastlichtstrahles auf bzw. in dem Objekt idealerweise einen Mäander beschreibt. Um eine schichtweise Bilddatenaufnahme zu ermöglichen, wird der Probentisch oder das Objektiv nach dem Abtasten einer Schicht verschoben und so die nächste abzutastende Schicht in die Fokusebene des  
20 Objektivs gebracht.

Eine Auflösungssteigerung in Richtung der optischen Achse lässt sich, wie in der Europäischen Patentschrift EP 0 491 289 mit dem Titel: „Doppelkonfokales Rastermikroskop“ beschrieben ist, durch eine  
25 Doppelobjektivanordnung (4Pi-Anordnung) erreichen. Das vom Beleuchtungssystem kommende Licht wird in zwei Teilstrahlen aufgespalten, die die Probe einander entgegenlaufend durch zwei spiegelsymmetrisch angeordnete Objektive gleichzeitig beleuchten. Die beiden Objektive sind auf verschiedenen Seiten der ihnen gemeinsamen Objektebene angeordnet. Im Objektpunkt bildet sich durch diese interferometrische Beleuchtung ein  
30 Interferenzmuster aus, das bei konstruktiver Interferenz ein Hauptmaximum und mehrere Nebenmaxima aufweist. Interferiert nur das Licht der Anregung, spricht man von 4Pi-Mikroskopie des Typs A, bei Interferenz des

Detektionslichtes von Typ B und bei gleichzeitiger Interferenz von Anregungslicht und Detektionslicht von Typ C. Mit diesem doppelkonfokalen Rastermikroskop kann im Vergleich zum konventionellen Rastermikroskop durch die interferometrische Beleuchtung eine erhöhte axiale Auflösung erzielt werden.

10 Aus DE 100 46 410 A1 ist eine optische Anordnung zum Beleuchten von Objekten, insbesondere von Fluoreszenzobjekten in einem doppelkonfokalen Rastermikroskop bekannt. Das Rastermikroskop weist ein die beiden Detektionsstrahlengänge vereinigendes Bauteil auf, wobei das vom Objekt kommende Licht an dem den Detektionsstrahlengang vereinigenden Bauteil  
15 zumindest weitgehend überlappend in eine Ausbreitungsrichtung vereinigbar ist und wobei Mittel zur Beeinflussung der Phase des vom Objekt kommenden Lichts vorgesehen sind, die zumindest in einem Teilstrahlengang des Detektionsstrahlengangs angeordnet sind. Das vereinigende Bauteil ist derart  
20 angeordnet, dass durch geeignete Einstellung der Phase des Detektionslichts in zumindest einem der beiden Detektionsstrahlengänge eine weitgehend verlustfreie Vereinigung des Detektionslichts ermöglicht ist.

Die bekannten doppelkonfokalen Rastermikroskope (4Pi-Mikroskope) haben den Nachteil, dass ungenutztes Anregungslicht und auch Detektionslicht  
25 ungewollt aus dem interferometrischen Strahlengang ausgekoppelt wird und ungenutzt verloren geht.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein 4Pi-Mikroskop mit erhöhter Anregungs- und oder Detektionseffizienz anzugeben.

25 Diese Aufgabe wird durch ein 4Pi-Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Reflexionsmittel vorgesehen ist, das von dem optischen Element ausgekoppeltes Beleuchtungslicht in das Interferometer zurück reflektiert und/oder das von dem optischen Element ausgekoppeltes und auf den Detektionsstrahlengang gelenktes Detektionslicht passieren lässt  
30 und weiteres, nicht auf den Detektionsstrahlengang gelenktes, ausgekoppeltes Detektionslicht in das Interferometer zurück reflektiert.

Die Erfindung hat den Vorteil, von geringeren Verlusten von Anregungslicht und von geringeren Verlusten an Detektionslicht. Vorteilhafterweise kann es durch die Rückreflexion des Detektionslichtes bei manchen Farbstoffen zur Fluoreszenzanregung anderer Übergangslinien kommen. Dies führt zu einer

5 Steigerung der Stokes-Shift und zu einer Verringerung der Kohärenzlänge, wodurch die Amplitude der Seitenmaxima im Fokusbereich (Sidelobes) reduziert werden, was vorteilhafterweise den Aufwand bei der Rückfaltung reduziert. Darüber hinaus wird hierdurch auch das Auflösungsvermögen etwas verbessert.

10 In einer bevorzugten Ausgestaltungsform umfasst das optische Element zumindest einen Strahlteiler, vorzugsweise einen Strahlteilerwürfel. In einer besonderen Variante ist das Reflexionsmittel unmittelbar an dem Strahlteiler angeordnet. Hierbei kann es sich beispielsweise um eine zumindest teilweise reflektierende Beschichtung handeln, die auf den Strahlteiler oder auf ein

15 separates Substrat aufgedampft ist.

Vorzugsweise ist zwischen dem optischen Element und dem Reflexionsmittel ein Verzögerungsmittel zur Kompensation von Phasensprüngen vorgesehen. In einer bevorzugten Variante bilden das optische Element, das Reflexionsmittel und das Verzögerungsmittel zusammen eine miteinander

20 verkittete optische Einheit. Als Verzögerungsmittel kann auch eine Driftstrecke vorgesehen sein, die beispielsweise über eine Piezo-Verstellung einstellbar ist.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltungsform ist das Reflexionsmittel farbselektiv reflektierend. Bei dieser Ausgestaltungsform kann ein

25 unterschiedlicher Reflektionsgrad für Licht der Wellenlänge des Anregungslichts und für Licht der Wellenlänge des Detektionslichts vorgesehen sein.

Das Reflexionsmittel umfasst vorzugsweise einen Spiegel, der in einer besonderen Variante gewölbt ist, um den optischen

30 Strahlverlaufseigenschaften des Interferometers optimal gerecht zu werden.

Auch die Kombination aus einem sowohl gewölbten als auch farbselektiv reflektierenden Spiegel ist eine denkbare Ausgestaltungsform.

In einer anderen bevorzugten Ausgestaltungsvariante ist das Reflexionsmittel teildurchlässig ausgebildet. In dieser Variante ist eine Kamera zur  
5 Überwachung der Justierung vorgesehen, die das durch das Reflexionsmittel tretende Beleuchtungs- und oder Detektionslicht empfängt. Vorzugsweise ist das 4Pi-Mikroskop derart ausgebildet, dass in der Nähe des optischen Elements ein reales Zwischenbild vorliegt, das mit der Kamera beobachtbar ist. Um eine Rückkopplung von aus dem Interferometer austretenden  
10 Anregungslichts auf die das Beleuchtungslicht erzeugende Lichtquelle zu vermeiden, ist in einer bevorzugten Variante zwischen der Lichtquelle und dem optischen Element eine – vorzugsweise einen Faraday-Rotator beinhaltende - optische Diode vorgesehen.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und  
15 wird anhand der Figur nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigt die einzige

Fig. 1 ein erfindungsgemäßes konfokales 4Pi-Mikroskop.

Fig. 1 zeigt ein erfindungsgemäßes konfokales 4Pi-Mikroskop mit einer  
20 Lichtquelle 1, die einen Beleuchtungslichtstrahl 3 erzeugt. Der Beleuchtungslichtstrahl 3 wird mit Hilfe einer Optik 5 auf die Beleuchtungslochblende 7 fokussiert, passiert diese und gelangt zu dem Hauptstrahlteiler 9. Der Hauptstrahlteiler 9 reflektiert den Beleuchtungslichtstrahl 3 durch die weitere Optik 11 zur  
25 Strahlableitvorrichtung 13, die einen kardanischn aufgehängten Scanspiegel 14 beinhaltet. Der Beleuchtungslichtstrahl 3 passiert die Scanoptik 15 und wird in das Interferometer 17 eingekoppelt. Zur Einkopplung beinhaltet das Interferometer 17 ein optisches Element 19, das als Strahlteilerwürfel 21 ausgebildet ist. Der Strahlteilerwürfel 21 teilt den Beleuchtungslichtstrahl 3 in  
30 einen ersten Beleuchtungslichtteilstrahl 23 und einen zweiten Beleuchtungslichtteilstrahl 25, die über die Umlenkspiegel 27 bzw. 29 und

durch die Mikroskopobjektive 31 bzw. 33 auf die Probe 35 gelenkt werden. Das von der Probe ausgehende Detektionslicht gelangt durch die beiden Mikroskopobjektive 31 und 33 und über die Umlenkspiegel 27 und 29 zurück zum optischen Element 19, das die beiden Detektionslichtteilstrahlen 37 und 39 vereinigt und einen Detektionslichtgesamtstrahl 41 auskoppelt und auf einen Detektionsstrahlengang lenkt, der entlang der Strahlableitvorrichtung 13 verläuft. Am Ende des Detektionsstrahlenganges erreicht der Detektionslichtgesamtstrahl 41 nach Passieren des Hauptstrahlteilers 9 und nach Passieren der Detektionslochblende 43 einen als Multibanddetektor 45 ausgebildeten Detektor 47. Das von dem optischen Element 19 ausgekoppelte und nicht auf den Detektionsstrahlengang gelenkte Detektionslicht wird mit Hilfe des als Spiegel 49 ausgebildeten Reflektionsmittels 51 in das Interferometer zurückreflektiert. Zwischen dem optischen Element 19 und dem Reflexionsmittel 51 befindet sich ein als planparallele Platte 53 ausgebildetes Verzögerungsmittel zur Kompensation von Phasensprüngen. Das Verzögerungsmittel, das optische Element 19 und das Reflexionsmittel 51 sind miteinander verkittet und bilden eine optische Einheit. In den beiden Teilstrahlengängen des Interferometers 17 ist je eine Optik 55, 57 vorgesehen, die das von der Probe 35 ausgehende Detektionslicht zu einem Zwischenbild 59 im Detektionsstrahlengang fokussiert. Die Optiken 55, 57 fokussieren auch das nicht auf den Detektionsstrahlengang gelenkte ausgekoppelte Detektionslicht zu einem weiteren Zwischenbild 61. Das Reflexionsmittel 51 ist exakt an der Stelle des weiteren Zwischenbildes 61 positioniert. Das durch das Reflexionsmittel in geringem Maße durchtretende Licht wird von einer Kamera 63 empfangen, wobei das Kamerasignal zur Überwachung der Justierung des Interferometers 17 dient.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

**Bezugszeichenliste:**

	1	Lichtquelle
5	3	Beleuchtungslichtstrahl
	5	Optik
	7	Beleuchtungslochblende
	9	Hauptstrahlteiler
	11	weitere Optik
10	13	Strahlablenkeinrichtung
	14	Scanspiegel
	15	Scanoptik
	17	Interferometer
	19	optisches Element
15	21	Strahlteilerwürfel
	23	erster Beleuchtungslichtteilstrahl
	25	zweiter Beleuchtungslichtteilstrahl
	27	Umlenkspiegel
	29	Umlenkspiegel
20	31	Mikroskopobjektiv
	33	Mikroskopobjektiv
	35	Probe
	37	Detektionslichtteilstrahl
	39	Detektionslichtteilstrahl
25	41	Detektionslichtgesamtstrahl
	43	Detektionslochblende
	45	Multibanddetektor
	47	Detektor
	49	Spiegel
30	51	Reflektionsmittel
	53	planparallele Platte
	55	Optik
	57	Optik



- 59 Zwischenbild
- 61 weiteres Zwischenbild
- 63 Kamera



Patentansprüche

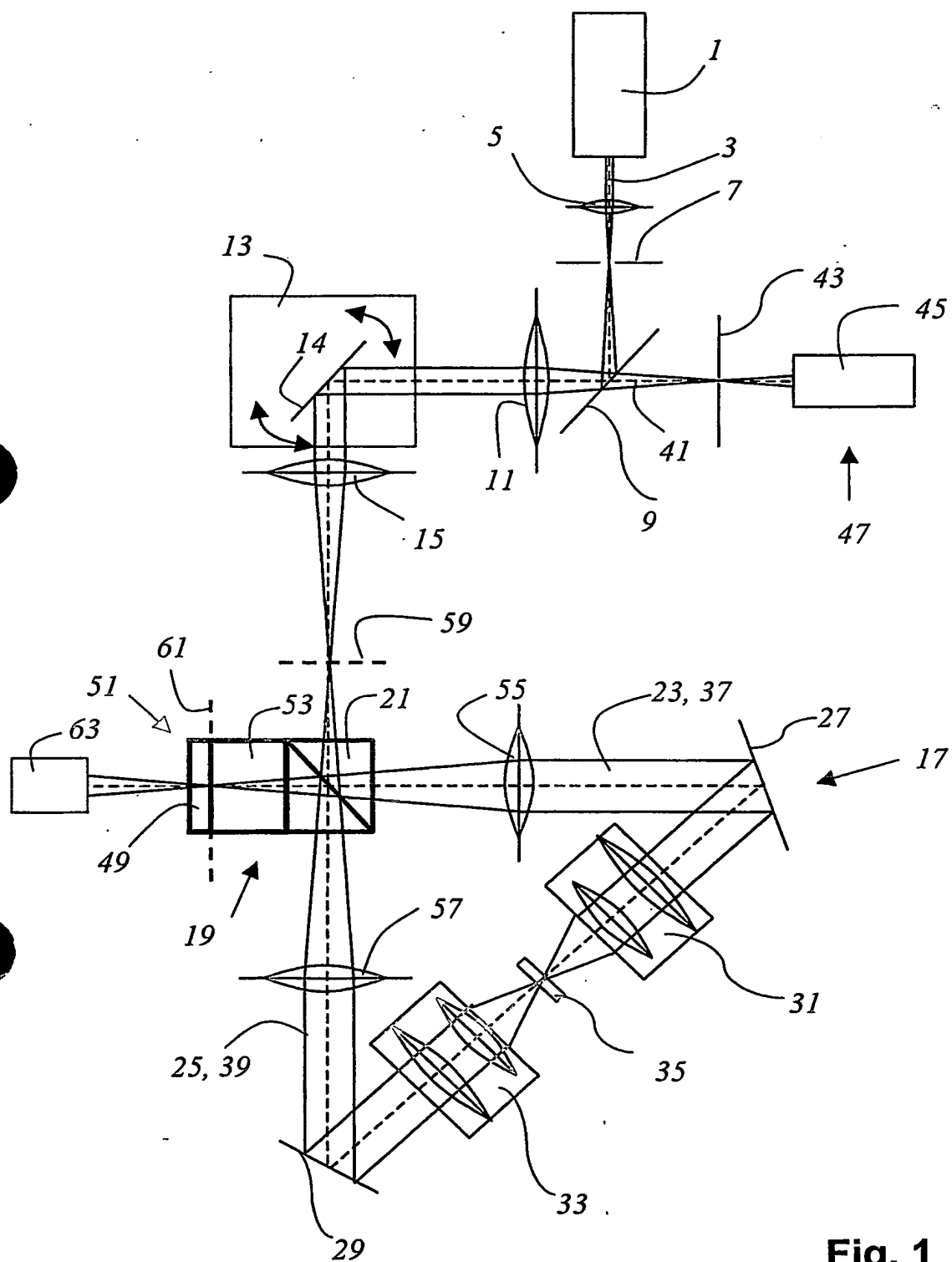
1. 4Pi-Mikroskop mit einem Interferometer, in dem zwei Objektive einander gegenüberliegend auf unterschiedlichen Seiten einer Probenebene angeordnet sind, und mit einem optischen Element, mit dem Beleuchtungslicht  
5 in das Interferometer einkoppelbar und/oder mit dem Detektionslicht aus dem Interferometer auskoppelbar und auf einen Detektionsstrahlengang lenkbar ist ist, dadurch gekennzeichnet, dass ein Reflexionsmittel vorgesehen ist, das von dem optischen Element ausgekoppeltes Beleuchtungslicht in das Interferometer zurück reflektiert und/oder das von dem optischen Element  
10 ausgekoppelte und auf den Detektionsstrahlengang gelenkte Detektionslicht passieren lässt und weiteres, nicht auf den Detektionsstrahlengang gelenktes, ausgekoppeltes Detektionslicht in das Interferometer zurück reflektiert.
2. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das optische Element zumindest einen Strahlteiler, vorzugsweise einen  
15 Strahlteilerwürfel, umfasst.
3. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Reflexionsmittel unmittelbar an dem Strahlteiler angeordnet ist.
4. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Reflexionsmittel eine zumindest teilweise reflektierende Beschichtung  
20 aufweist.
5. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Reflexionsmittel auf den Strahlteiler aufgedampft ist.
6. 4Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Reflexionsmittel farbselektiv reflektierend ist.
- 25 7. 4Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Reflexionsmittel einen Spiegel umfasst.
8. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Spiegel gewölbt ist.

9. 4Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen dem optischen Element und dem Reflexionsmittel ein Verzögerungsmittel zur Kompensation von Phasensprüngen vorgesehen ist.
- 5 10. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das optischen Element, das Reflexionsmittel und das Verzögerungsmittel zu einer – vorzugsweise verkitteten - Einheit zusammengefasst sind.
11. 4Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Reflexionsmittel teildurchlässig ist.
- 10 12. 4Pi-Mikroskop nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Kamera zur Überwachung der Justierung vorgesehen ist, die das durch das Reflexionsmittel tretende Beleuchtungs- und/oder Detektionslicht empfängt.
- 15 13. 4Pi-Mikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass eine Lichtquelle vorgesehen ist, die das Beleuchtungslicht erzeugt und dass zwischen der Lichtquelle und dem optischen Element eine - vorzugsweise einen Faraday-Rotator beinhaltende - optische Diode vorgesehen ist.

### Zusammenfassung

- Ein 4Pi-Mikroskop mit einem Interferometer, in dem zwei Objektive einander gegenüberliegend auf unterschiedlichen Seiten einer Probenebene angeordnet sind, und mit einem optischen Element, mit dem Beleuchtungslicht in das Interferometer einkoppelbar und/oder mit dem Detektionslicht aus dem Interferometer auskoppelbar und auf einen Detektionsstrahlengang lenkbar ist beinhaltet ein Reflexionsmittel, das von dem optischen Element ausgekoppeltes Beleuchtungslicht in das Interferometer zurück reflektiert und/oder das von dem optischen Element ausgekoppelte und auf den Detektionsstrahlengang gelenkte Detektionslicht passieren lässt und weiteres, nicht auf den Detektionsstrahlengang gelenktes, ausgekoppeltes Detektionslicht in das Interferometer zurück reflektiert.

15 Fig. 1



**Fig. 1**